



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infeciosas

Vacinação antimalária:
***RTS,S* e vacinas de esporozoíto inativado de**
Plasmodium falciparum

Ana Luzia Cabrita Condessa

março de 2018



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infecciosas

Vacinação antimalária:
***RTS,S* e vacinas de esporozoíto inativado de**
Plasmodium falciparum

Ana Luzia Cabrita Condessa

Orientador:

Dr.ª Alexandra Zagalo e Melo

março de 2018

Resumo

Apesar da introdução de medidas profiláticas, a malária constitui ainda uma das doenças infecciosas mais preocupantes, registando-se 216 milhões de pessoas com malária clínica e 445 000 mortes a nível mundial em 2016, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde.¹

Como tal, vários esforços têm sido realizados na investigação de uma vacina que impeça o desenvolvimento de malária clínica em grupos considerados de maior risco, nomeadamente, crianças de regiões endémicas, grávidas e adultos não imunes que se deslocam para locais endémicos. Existem várias dificuldades inerentes a uma vacina antiparasitária. A malária em humanos pode ser desencadeada por cinco espécies, sendo *Plasmodium falciparum* o parasita alvo da maioria das candidatas a vacina, por ser o mais prevalente na África Subsaariana, associando-se, também, a maior morbilidade e mortalidade. A vacina deverá bloquear o desenvolvimento do parasita, sendo essencial evitar a infeção eritrocitária.

Atualmente, existem cerca de trinta potenciais vacinas em investigação que atuam no estadio pré-eritrocitário de *Plasmodium falciparum*, mas a *RTS,S*, vacina subunitária, é a que se encontra numa fase mais avançada de desenvolvimento, sendo a única a ser aprovada por uma entidade reguladora. Por outro lado, outras vacinas pré-eritrocitárias, nomeadamente, as vacinas de esporozoítos de *Plasmodium falciparum* atenuadas por irradiação, quimioprofilaxia ou por mutações genéticas induzidas revelam também resultados promissores relativamente à capacidade de proteção, tendo sofrido uma evolução muito rápida nos últimos anos.

Neste trabalho, pretende-se fazer uma revisão de literatura existente de 2007 a 2017, com o objetivo de caracterizar e analisar os dois grupos de vacinas, *RTS,S* e vacinas de esporozoítos inativados de *Plasmodium falciparum*, tendo em conta a sua eficácia, imunogenicidade e segurança.

Palavras-Chave: Vacina contra malária, *Plasmodium falciparum*, *RTS,S*, Vacinas de esporozoítos inativados

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML

Abstract

Despite the introduction of prophylactic measures, malaria is still one of the most challenging infectious diseases, with 216 million people with clinical malaria and 445,000 deaths worldwide in 2016, according to *World Health Organization's* data.¹

Globally, many efforts have been made in the investigation of a vaccine which prevents the development of malaria in high-risk groups, namely children from endemic regions, pregnant women and non-immune adults who travel to endemic locations. However, there are several difficulties inherent to an antiparasitic vaccine. Although malaria can be triggered by five species in humans, *Plasmodium falciparum* is the target parasite of most vaccine candidates, since it is the most prevalent species in Sub-Saharan Africa and it is associated with increased morbidity and mortality. The vaccine can take action by blocking parasite development and then, avoid erythrocyte infection, which is crucial.

About thirty potential vaccines targeting pre-erythrocyte stage of *Plasmodium falciparum* are under investigation but the *RTS,S*, subunit vaccine, is the only one which is approved by a regulatory entity and on the later stages of development. On the other hand, other pre-erythrocytes vaccines, *Plasmodium falciparum* whole sporozoite vaccines attenuated by irradiation, chemoprophylaxis or induced genetic mutations also show promising results and have undergone a rapid evolution in recent years.

The aim of this study is to review the literature between 2007 and 2017 on malaria vaccines and to characterize these two groups of vaccines, *RTS,S* and inactivated sporozoite vaccines of *Plasmodium falciparum*, taking into account their efficacy, immunogenicity and safety.

Keywords: Malaria vaccine, *Plasmodium falciparum*, *RTS,S*, Inactivated sporozoite vaccines

Índice

Resumo	2
Abstract	3
Agradecimentos	5
Índice de Abreviaturas e Siglas.....	6
1. Introdução	8
2. Metodologia.....	9
3. Resultados.....	9
3.1 Malária	9
3.2. Desenvolvimento de vacina antimalária	12
3.3. Vacina <i>RTS,S</i>	13
3.3.1. Desenvolvimento de <i>RTS,S</i>	13
3.3.2. Perspetivas para o futuro.....	19
3.4. Vacina de esporozoíto inativado de <i>Plasmodium falciparum</i>	20
3.4.1. Desenvolvimento das vacinas <i>PfSPZ</i>	20
3.4.2. Outras vacinas de esporozoítos atenuados.....	26
3.4.3. Perspetivas para o futuro.....	28
4. Discussão de Resultados.....	29
5. Conclusão	32
6. Bibliografia.....	33
7. Anexos	38

Agradecimentos

Queria agradecer à minha orientadora da tese, Dr.^a Alexandra Zagalo e Melo, por ter sugerido este tema, bem como por todas as sugestões e correções ao longo da construção deste trabalho.

Gostaria também de agradecer à Clínica Universitária de Doenças Infeciosas e Parasitárias pela disponibilidade e apoio.

Deixo o meu agradecimento, também, aos meus pais, ao meu irmão, ao João e aos meus amigos do curso, por todo o apoio ao longo deste percurso.

Índice de Abreviaturas e Siglas

ACT - *Artemisin Combined Therapy*

AgHbs - Antígeno de superfície do Vírus de Hepatite B

ALT - Alanina aminotransferase

Anti-CSP - Anticorpo específico contra proteína circunsporozoíta

AS - *Adjuvant System*

CD40L - Ligando do recetor CD40

CHMI - *Controlled Human Malaria Infection*

CSP - *Circunsporozoite protein*

EMA- *European Medicines Agency*

FDA - *Food and Drug Administration*

GAP- *Genetically Attenuated Parasite*

GSK - *GlaxoSmithKline*

IFN - Interferão

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

Inc. – *Incorporation*

IR - *Incidence Ratio*

MPL - Monofosforil lípido

MVI - *Malaria Vaccine Initiative*

NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

NK - Células *Natural Killers*

NO - *Nitric Oxid*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PATH - *Program for Appropriate Technology in Health*

PBS - *Phosphate-buffered saline*

Pl - *Plasmodium*

Pf - *Plasmodium falciparum*

PfSPZ - *Plasmodium falciparum sporozoite*

RDT - *Rapid Diagnostic Tests*

Spp. - Espécies

SPZ - *Sporozoite*

TNF-alfa - *Tumor Necrosis Factor alpha*

VLPs - *Virus Like Particles*

VRC - *Vaccine Research Center*

WHO - *World Health Organization*

WRAIR - *Walter Reed Army Institute of Research*

1. Introdução

A malária é uma doença infecciosa considerada ainda uma das mais sérias e perigosas para a saúde pública. Em 2016, foram estimados 216 milhões casos malária clínica no mundo (anexo 1), com um aumento de 5 milhões de casos desde o ano anterior, verificando-se uma maior incidência na África Subsariana (90%), Sudeste Asiático (3%) e no Mediterrâneo Oriental (2%).^{1,2} No mesmo ano, foram estimadas 445 000 mortes por malária a nível mundial (anexo 2), 91% dos quais ocorriam na África Subsariana.¹ No cômputo geral, ocorreram menos mil mortes do que no ano anterior, 2015.²

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a evolução, nos últimos anos, no tratamento e prevenção da malária foram responsáveis por uma descida de 37% na incidência da malária e de 60% na taxa de mortalidade, acompanhada de redução de casos de parasitemia e de morbilidade mundial de 2000 a 2015. Assim, durante este período, a malária passou de principal causa de morte a quarta causa de morte em crianças de África Subsariana com menos de cinco anos (anexo 3), constituindo 10% das mortes de crianças desta região.³

Entre 2015 e 2016, verificou-se a estabilização da taxa de mortalidade no Sudeste Asiático e em África, e o seu aumento no Mediterrâneo Oriental e no continente Americano.¹

Apesar da redução observada, a taxa de morbilidade e mortalidade continuam elevadas em várias regiões endémicas, nomeadamente na África Subsariana, onde 57% da população vive em áreas que persistem com transmissão elevada.² Tal poderá ser explicado pela existência de novos casos de resistência a antimaláricos por diversidade genética dos parasitas, resistência dos vetores aos inseticidas e por mecanismos evasivos dos parasitas.⁴

Para se evitar a transmissão e desenvolvimento de malária clínica e grave, surge a necessidade de, além de novos antimaláricos, criar uma vacina segura e efetiva que possa complementar as restantes medidas de prevenção. Assim, é reconhecido pelos especialistas que a criação da vacina contra a malária é atualmente uma prioridade na saúde pública.²

Neste sentido, este artigo de revisão de literatura propõe-se abordar dois tipos de vacinas candidatas: *RTS,S* e as vacinas de esporozoítos de *Plasmodium falciparum*

inativado. A opção pelas mesmas deveu-se ao fato de se encontrarem em fases avançadas de ensaios clínicos, perspetivando-se o seu uso preventivo em larga escala nas populações de risco.

2. Metodologia

Foram pesquisados artigos na base de dados da *Pubmed*, entre agosto e novembro de 2017, com as seguintes palavras-chave: (a) *malaria vaccine* (b) *RTS,S* (c) *sporozoite vaccine* (d) *PfSPZ* (e) *PfSPZ-CVac*. Foram excluídos artigos não escritos em língua inglesa. Todos os artigos publicados entre 2007 e 2017 foram compilados, e os considerados relevantes, face ao objetivo do trabalho, foram revistos.

A pesquisa inicial foi complementada com artigos adicionais identificados através da revisão das referências bibliográficas das publicações selecionadas bem como através de *webografia* de instituições de renome como a Organização Mundial de Saúde, *Program for Appropriate Technology in Health - Malaria Vaccine Initiative* (PATH-MVI), *GlaxoSmithKline* e *Sanaria Inc.*

3. Resultados

3.1 Malária

A Malária é uma doença provocada pela infeção de protozoário *Plasmodium* spp., sendo as espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* responsáveis pela infeção humana.^{5,6} *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* são os parasitas associados a maior impacto na saúde pública da doença, sendo responsáveis pela maior incidência da malária. Contudo, *Plasmodium knowlesi*, que não infeta exclusivamente humanos, tem também causado complicações graves e mortalidade significativa principalmente no Sudeste Asiático. Por outro lado, *Plasmodium falciparum* encontra-se em todas as regiões

endêmicas, sendo predominante na África Subsaariana, ao passo que *Plasmodium vivax* é encontrado na América Central e do Sul, Sudeste Asiático e Etiópia.⁶

É maioritariamente transmitida através da picada do mosquito fêmea *Anopheles* *genus* (vetor) infetado com o parasita podendo, ainda que raramente, ser transmitida por transfusão ou transmissão vertical.²

O ciclo de vida do parasita inicia-se com a injeção, pelos mosquitos infetados, de *Plasmodium* sob forma de esporozoítos, que atravessam a pele do indivíduo onde poderão ser fagocitados por células dendríticas, para posterior apresentação do antígeno no gânglio linfático para o qual drena a pele afetada. Através da rede linfática, alguns esporozoítos atingem os hepatócitos, onde podem permanecer latentes no seu interior e multiplicam-se por divisão assexuada (esquizogonia). Estes são libertados na corrente sanguínea sob forma de merozoítos que podem infetar os eritrócitos independentemente da sua fase maturativa (predominantemente *Plasmodium falciparum*), ou reticulócitos (mais predominante no *Plasmodium vivax*) e replicar-se. Uma fração dos merozoítos diferencia-se e matura em gametócitos masculinos e femininos, e infetam o hospedeiro mosquito aquando a sua refeição sanguínea.^{6,7,8}

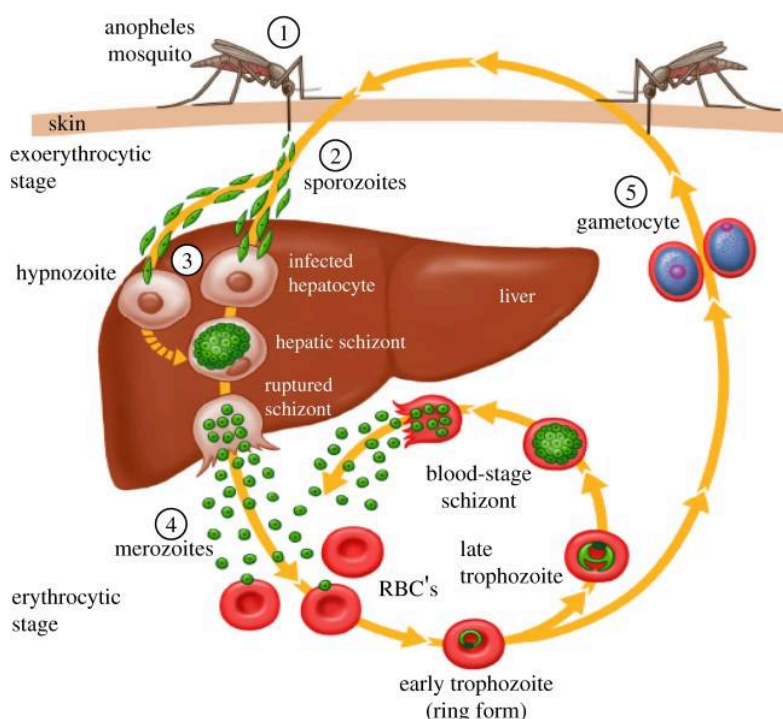


Figura 1 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida do parasita *Plasmodium* spp, de Hill, A. (2011). Vaccines against malaria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1579), p.4.⁸

A transmissão através da picada por *Anopheles* ocorre, mais frequentemente, ao nascer e pôr do sol e na proximidade do local de reprodução do mosquito: reservatórios de água doce, salobra ou doméstica. Para além do tempo de vida do mosquito e a sua maior preferência em picar humanos, a temperatura, humidade e níveis de controlo do vetor correlacionam-se com a intensidade de transmissão. Más condições habitacionais e escasso acesso a cuidados de saúde contribuem para maior intensidade de transmissão. Em locais de transmissão contínua de malária e indivíduos não imunes e crianças com menos de cinco anos são os grupos mais suscetíveis de apresentar maior morbilidade e mortalidade. As grávidas apresentam risco mais elevado de infeção. Além do mais, dada a afinidade do parasita para a vasculatura da placenta, verifica-se maior risco para o feto por parasitemia na placenta, e risco superior de aborto.²

A infeção de *Plasmodium spp.* poderá ter consequências de diferente grau de gravidade. A malária pode ser assintomática, clínica não complicada ou grave. É assintomática quando o parasita se encontra latente através dos hipnozoítos: a malária clínica surge após infeção eritrocitária com início de sintomas sete a dez dias após a picada inicial (febrícula, calafrios, mialgias, sintomas digestivos), podendo ser súbitos (paroxismos) e progredir quadro de febre elevada acompanhada por diaforese intensa, decorrente da hemólise dos eritrócitos infetados. A malária grave pode ser fatal e cursa com anemia grave e manifestações de falência multiorgânica, como por exemplo, síndrome de dificuldade respiratória aguda, insuficiência renal e malária cerebral. Torna-se deste modo evidente a necessidade de diagnóstico precoce e instituição atempada de terapêutica adequada.⁷

Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico de malária baseia-se na presença de febre e na confirmação de parasitemia [parasitas detetados por microscopia ótica numa amostra de sangue periférico ou teste rápido de diagnóstico (RDT)]. O risco epidemiológico é, também, um fator preponderante.²

A prevenção em populações vulneráveis pode ser conseguida por controlo do vetor (inseticidas - incluindo *sprays* interiores, larvicidas, destruição de reservatórios de reprodução do mosquito e redes mosquiteiras impregnadas com inseticida), quimioprevenção e vacinas.^{2,6} A quimioprevenção é uma estratégia efetiva que engloba o tratamento preventivo intermitente para grávidas e crianças e quimioprofilaxia sazonal para crianças, com menos de cinco anos, nas regiões de transmissão moderada a elevada

na África Subsaariana. Medidas quimioproláticas em indivíduos de zonas não endêmicas, não imunes, que se deslocam de zonas endêmicas são, também, cruciais.⁹

3.2. Desenvolvimento de vacina antimalária

Há mais de setenta anos, iniciaram-se estudos para o desenvolvimento de uma vacina antimalária, com imunização com esporozoítos em modelos animais como primeiro objeto de estudo.¹⁰ Apesar dos vários estudos decorridos desde então, os resultados não foram satisfatórios. Na última década, verificou-se, no entanto, o crescimento exponencial de vacinas antimalárias. Atualmente, trinta candidatas a vacina contra *Plasmodium falciparum* estão a ser avaliadas em ensaios pré-clínicos e clínicos.²

Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e efetiva, será necessário selecionar o potencial alvo antigénico para a atuação da vacina e determinar a fase de ciclo em que atua.⁴ As populações alvos da vacina deverão ser os grupos considerados de risco já citados.²

Plasmodium falciparum apresenta maior relação com o aumento de mortalidade e morbilidade, do que as outras espécies, para além de ser a espécie mais prevalente na África Subsaariana.^{4,11} Como tal, tem sido o principal foco de pesquisa para o desenvolvimento de vacina. Apesar de *Plasmodium vivax* atualmente ser objeto de investigação, pelo aumento significativo do número de casos de malária grave por esta espécie, a ausência de culturas para esta espécie é um fator limitante.

Deste modo, a imunidade contra *Plasmodium falciparum* tem sido o principal foco de investigação nas vacinas, pelo que este artigo de revisão se irá centrar em vacinas contra este parasita. As vacinas poderão ser vivas atenuadas, mortas ou inativadas e subunitárias.

O desenvolvimento da vacina para *Plasmodium falciparum* contém, entretanto, algumas dificuldades inerentes. O fato do ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* ser multifacetado e a elevada diversidade genética do parasita e do humano dificultam este processo.⁴

As vacinas podem ser categorizadas, quanto à fase de atuação em três grupos: as vacinas pré-eritrócitárias (atuam no esporozoítos, na fase hepática), eritrócitárias (que

atuam nos estadios sanguíneos assexuados), e as vacinas de bloqueio de transmissão (atuam nos estadios sexuados).¹¹

Este artigo irá, contudo, focar-se nas vacinas pré-eritrocitárias em desenvolvimento, pois estas têm demonstrado resultados mais promissores comparativamente às dos restantes grupos. Como atuam no estadio pré-eritrocitário, podem evitar a infeção hepática e consequentemente a disseminação sanguínea prevenindo, assim, o desenvolvimento de malária clínica. Ao impedir, também, a produção de gametócitos, o risco de infeção do mosquito e subsequente transmissão são diminuídos, pelo que as populações de risco poderão ser indiretamente beneficiadas.¹¹

A OMS (*WHO Malaria Vaccine technology Roadmap*) definiu um objetivo para 2030 de desenvolver uma vacina contra malária que oferecesse eficácia protetora de pelo menos 75% contra malária clínica e o desenvolvimento de vacinas que reduzissem a transmissão do parasita durante três meses (idealmente mais de seis meses), contra infeções de *Plasmodium falciparum* com número máximo de três doses.¹²

3.3. Vacina *RTS,S*

A *RTS,S/AS01 (Mosquirix™)* é a vacina antimalárica que se encontra numa fase de desenvolvimento mais avançada, sendo a primeira e única a nível Mundial a completar, com sucesso, um ensaio clínico de fase III .¹³

Esta foi também a primeira vacina contra a malária a receber um parecer científico positivo de uma autoridade reguladora de medicamentos, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), em Julho de 2015. Contudo, ainda não recebeu aprovação pelas Autoridades Reguladoras Nacionais nos países de África Subsaariana.⁹

3.3.1. Desenvolvimento de *RTS,S*

- Origem:

A *RTS,S* foi criada em 1987 nos laboratórios de GSK e o seu desenvolvimento contou com colaboração de *Walter Reed Army Institute for Research*, e *PATH's Malaria*

Vaccine Initiative (PATH/ MVI), e com o financiamento da fundação *Bill & Melinda Gates Foundation*.

- Composição e Formulação:

Consiste numa vacina proteica recombinante híbrida que possui como base de antígeno a proteína de superfície de *Plasmodium falciparum*, conhecida como proteína circunsporozoíta (CSP). É constituída por um polipéptido híbrido *RTS*, que resulta da fusão de um segmento de CSP, *RT*, com o antígeno de superfície da hepatite B (AgHbs). O segmento *RT* inclui sequências repetitivas em *tandem* com epítomos de células B (R) e epítomos de células T (T). A coexpressão de *RTS* e AgHbs não fundidos (*RTS,S*) por *Saccharomyces cerevisiae*, permite a sua transformação em partículas semelhantes a vírus (VLPs).^{2,6,9}

A formulação farmacêutica corresponde a um pó (25 ug de *RTS,S*) que posteriormente será liofilizado e reconstituído a uma suspensão (com sistema adjuvante –*AS01* ou *AS02*). A vacina deverá ser armazenada entre 2-8°C, sendo administrada por via intramuscular. Os frascos de vacina reconstituída apenas têm duração de seis horas após a sua abertura.^{2,9}

O sistema adjuvante é utilizado com o objetivo de aumentar a imunogenicidade e garantir simultaneamente estabilização do antígeno de *RTS,S*. *AS01* e *AS02* foram os sistemas adjuvantes desenvolvidos por GSK, sendo ambos constituídos por moléculas imunomoduladoras 3-O-desacil-4-monofosforil lípido A (MPL) e uma saponina *Quillaja saponaria* (QS21). As duas diferem na formulação, já que *AS02* corresponde a uma emulsão água em óleo, ao contrário da *AS01* cuja formulação é lipossomal.^{2,9,11}

- Ensaios clínicos de *RTS,S*:

RTS,S foi inicialmente avaliada quanto à sua eficácia e ao seu perfil de segurança durante os ensaios clínicos de fase I e II, que decorreram primeiramente em populações adultas não imunes (anexo 4), nomeadamente em voluntários dos Estados Unidos da América e Bélgica, e, posteriormente, em adultos africanos semimunes residentes em países endémicos, como Gâmbia e Quênia (anexo 5).^{13,14} A eficácia persistentemente

promissora obtida com *RTS,S* em ambas as populações, nos estudos I, IIA e IIB, contribuiu para continuar o desenvolvimento da vacina e estender a avaliação de *RTS,S* em crianças africanas de regiões endémicas (anexo 6).¹⁴

A eficácia e o perfil de segurança foram em seguida avaliados em ensaios clínicos de fase III, tendo em 2009 iniciado o maior ensaio clínico para vacinação da Malária em África, com 15 459 crianças em onze locais de sete países Africanos (Burkina Faso, Gabão, Gana, Quênia, Malawi, Moçambique e Tanzânia) que terminou em 2014.¹³ As crianças participantes foram divididas em duas categorias consoante as idades: de seis a doze semanas e de cinco a dezassete meses. A vacina de controlo nos ensaios para o grupo de crianças dos cinco aos dezassete meses foi a vacina da raiva, enquanto para o grupo de bebés entre seis a doze semanas foram a vacinas de *Meningococcus C* e Hepatite B.¹¹

- Eficácia:

Nos ensaios clínicos analisados, a eficácia foi estimada através da seguinte equação: $1 - IR$, sendo IR o rácio de incidência determinado pelo quociente entre número total de eventos sobre o tempo de *follow up* em *RTS,S* e o número total de eventos sobre o tempo de *follow up* no grupo de controlo. Este rácio aplica-se a todos os episódios de malária clínica e de malária grave, anemia causada por malária, hospitalização por malária, malária fulminante, e outras patologias graves (sépsis, pneumonia com indicação para hospitalização, hospitalização por qualquer outra causa, mortalidade por todas as causas e necessidade de transfusões sanguíneas) e *endpoints* prevalentes (parasitémia, anemia moderada a grave).¹⁴

- Ensaaios de Fase I e II

Segundo uma revisão sistemática de *Agnandji et al.* (2015), nos ensaios de fase I e II, a *RTS,S* demonstrou ser consistentemente eficaz para população de adultos expostos e não expostos à malária após a terceira dose. Em adultos voluntários não expostos, a eficácia revelou ser significativa até seis meses, tendo garantido a proteção de 41% nos voluntários imunizados com *RTS,S/AS02* (anexo 4).¹⁴

Com a extensão dos ensaios para adultos semimunes nas regiões endêmicas, obtiveram-se resultados igualmente favoráveis, tendo-se verificado o aumento de proteção com uma quarta dose no ano subsequente (anexo 5).¹⁴ Os resultados obtidos em adultos com a vacina permitiram o estudo da vacina em crianças.¹³

Após ter garantido proteção parcial durante quatro anos após a administração de *RTS,S* em duas mil e vinte e duas crianças Moçambicanas de idades compreendidas entre um a quatro anos (anexo 6), esta vacina começou a ser investigada em crianças com mais de cinco meses.^{14,15} Segundo um estudo multicêntrico, *RTS,S* poderia ser administrada conjuntamente com vacinas do Programa de Vacinação, já que a administração das últimas demonstrou não reduzir a proteção conferida por *RTS,S*.¹⁶ Em crianças de cinco a dezassete meses de Kilifi (Quênia) e Korogwe (Tanzânia), a *RTS,S* revelou ser segura e eficaz para o primeiro e para todos os episódios, com eficácia de 53% (anexo 6) e 56%, respetivamente, e com proteção até quatro anos quando administrada em três doses em Kilifi.^{17,18} Contudo, verificou-se redução da proteção ao longo do tempo em *follow-ups* de quatro e de sete anos, atingindo um valor negativo de eficácia, a partir do quarto ano, sendo a eventual proteção indetetável após sete anos.^{18,19}

É de salientar a variação da eficácia de acordo com diversas variáveis, nomeadamente, a intensidade da exposição e o sistema adjuvante utilizado. Efetivamente, em locais de exposição elevada, a eficácia revelou ser inferior (15.9%), comparativamente à dos locais de exposição baixa a moderada (45.1%).¹⁸ Além disso, a redução da eficácia ao longo do tempo observada nos *follow-ups* supracitados foi mais acentuada em locais de exposição moderada a elevada.^{18,19} Relativamente ao sistema adjuvante utilizado, *AS02* demonstrou menor eficácia (47%) quando comparado com *AS01* (60%), de acordo com uma análise por subgrupos.²⁰ Warimew *et al.* (2013) acrescentam, ainda, o rácio monócitos linfócitos (ML) no sangue periférico como outro fator, sendo que, segundo o mesmo, indivíduos com o rácio mais elevado apresentam graus de proteção menores após administração da vacina. Assim, este rácio poderia prever as crianças altamente protegidas e as refratárias à vacina *RTS,S* antes da vacinação.²¹

Por outro lado, não foram demonstradas alterações significativas da eficácia nem com a utilização das redes mosquiteiras nem com o género da população.

- Ensaio de Fase III

No ensaio de fase III, com a administração do adjuvante mais eficaz, AS01, e na presença de práticas de controlo da malária como o uso de redes mosquiteiras impregnadas com inseticida, os resultados foram consistentes com os de fase II.^{22,23,24} Assistiu-se, em crianças de cinco a dezassete meses, a uma redução de aproximadamente 50% dos casos de malária clínica e 47% de malária severa, após a administração de três doses da vacina no período de doze meses.²² Apesar da redução da proteção conferida pela vacina ao longo do tempo, a administração de uma quarta dose da vacina, dezoito meses após a primeira dose, permitiu prolongar a proteção, atingindo eficácia de 39% aos quatro anos de seguimento. Foram evitados 1774 casos de malária clínica por mil crianças vacinadas (de cinco a dezassete meses), após quarenta e oito meses de *follow-up*.^{22, 23}. Contudo, mesmo após uma quarta dose, continuou a existir um decréscimo da proteção.²⁴ Ao contrário dos ensaios de fase II, no ensaio de fase III, os valores de eficácia contra malária clínica foram distintos entre crianças de seis a doze semanas e cinco a dezassete meses, sendo mais reduzida nas primeiras, com 27% de eficácia.^{22, 25}

- **Imunogenicidade:**

Os mecanismos de proteção por *RTS,S* não são bem conhecidos.²⁶ Constatou-se que se trata de uma vacina altamente imunogénica, devido à presença de epítomos que induzem resposta imune humoral (anticorpos anti-CSP) e resposta celular (T CD4+ específica para CSP), específicas para a proteína CSP do *Plasmodium falciparum*.^{27, 28} A imunidade humoral aparenta ser fulcral na resposta protetora, pois os anticorpos podem impedir a infeção pré-eritrocitária, por neutralização direta do esporozoítio, opsonização (através de fagocitose) ou por bloqueio da invasão do parasita para os hepatócitos.²⁹ Os anticorpos responsáveis por esta proteção, até agora identificados, são os IgG anti-CSP.^{27,29} Foi demonstrada relação entre os níveis séricos destes anticorpos e a proteção contra a infeção por *Plasmodium falciparum* em adultos expostos e não expostos e em crianças de regiões endémicas com idade superior dezassete meses, já que em crianças de cinco a dezassete meses esta relação não foi linear.^{28,30} A mesma relação não foi evidenciada relativamente à proteção contra malária clínica.²⁸

Entretanto, a *RTS,S* revelou ser imunogénica tanto para crianças entre seis e doze semanas de idade como em crianças entre cinco e dezassete meses.^{30, 31} À semelhança do que acontece com a eficácia, os títulos séricos anti-CSP diminuíam ao longo do tempo após a vacinação, estando mesmo assim sempre mais elevados do que os do grupo de controlo.^{30,32}

Além dos níveis séricos, a qualidade dos anticorpos produzidos (afinidade, avidéz, isótipo e subclasse) pode determinar a capacidade de proteção da *RTS,S*.²⁷ Destes parâmetros, o mais fácil de determinar é a avidéz, que traduz a capacidade de interação entre o antígeno e anticorpo, perante a adição de anticorpos no soro com diferentes afinidades ao epítipo.^{27,28} Segundo *Olotu et al.* (2014), não foi encontrada relação entre a avidéz dos anticorpos produzidos e proteção de *RTS,S/AS01*, quando títulos séricos são idênticos.²⁸ Todavia, de acordo com *Ajua et al.* (2015), a diferença de concentração sérica e avidéz entre a segunda e a terceira dose de *RTS,S* poderá ser melhor preditora de imunidade humoral efetiva do que a concentração sérica após a terceira dose, por revelar a evolução das respostas dos anticorpos até o próximo contato com o parasita.²⁷ Outra vantagem da avidéz corresponde ao fato de não decrescer ao longo do tempo, pelo que pode determinar o estado imunológico meses após a vacinação.^{27,28}

Para a vacina garantir proteção a longo prazo e evitar reinfeções, é necessário que a vacina *RTS,S* reproduza uma resposta mediada por células T e B memória específicas, sendo as células T CD4+ as principais mediadoras, por promoverem respostas humoral e celular.^{27, 33} Os estudos relativos às respostas celulares induzidas por parasitas são, no entanto, limitados. Entretanto, em imunizados com a vacina, o número de células T CD4+ produtoras de IL2, TNF-alfa, IFN-γ e CD40L demonstrou ser superior ao do grupo de controlo, sendo que IL-2 revelou ser fundamental.^{33,34} Não existe ainda evidência da atuação das células T CD8+, já que a sua resposta nos vários ensaios não foi significativa.³³

- Segurança:

A *RTS,S* revelou nos ensaios clínicos de fase I, II e III um perfil de segurança e tolerância favoráveis, apesar ter demonstrado consistentemente maior número de efeitos adversos face às vacinas controlo em adultos e crianças das duas categorias de idade.¹⁴ Nos ensaios clínicos, a febre e a dor local foram as manifestações mais prevalentes.^{14, 35} Os efeitos adversos observados nos ensaios foram maioritariamente sintomas locais,

edema e dor no local da injeção, enquanto os sintomas gerais foram menos frequentes, com anorexia e febre como manifestações mais prevalentes.³⁵ Com *RTS,S* associado a *AS02*, os sintomas locais revelaram ser mais frequentes do que com *AS01*.³¹ Além disso, os sintomas locais e gerais nos ensaios I, II e III, após a imunização, foram maioritariamente de intensidade ligeira a moderada, e os eventos graves, mais raros.^{14,31,35} Ainda assim, algumas crianças vacinadas com *RTS,S* desenvolveram convulsões febris (com recuperação total em sete dias), gastroenterite, pneumonia, asma e hérnia umbilical encarcerada. Nenhum desses eventos foi considerado relacionado com a vacina estudada, e todas as crianças recuperaram.^{14, 35}

Apesar da incidência dos efeitos adversos graves ter sido semelhante nos grupos de crianças imunizadas e não imunizadas com *RTS,S*, salienta-se uma discrepância no número de casos de meningite nos ensaios de fase II e III, em crianças de cinco a dezassete meses.^{14, 23} O número de casos foi superior nas crianças imunizadas, incluindo as que receberam uma quarta dose. Foram detetados vinte e um casos de meningite em 5948 das crianças imunizadas com *RTS,S/AS01*, e apenas um caso em 2974 crianças do grupo de controlo.^{23, 35} A relação causal entre meningite e a *RTS,S/AS01* ainda não está estabelecida.²³ Alterações analíticas bioquímicas e hematológicas, como anemia, alterações dos níveis de leucócitos e plaquetas e elevação do ALT, também ocorreram, mas nenhuma dessas alterações foi clinicamente significativa.³⁵ Apesar da eficácia da vacina, não foi, no entanto, observada redução significativa da taxa de mortalidade por malária nas crianças vacinadas com *RTS,S/AS01*.²³

3.3.2. Perspetivas para o futuro

Prevê-se que, ao adicionar *RTS,S/AS01* aos programas de controlo existentes, se possa evitar entre cem a quinhentas e oitenta mortes por malária e entre quarenta e cinco mil a oitenta mil episódios clínicos por cem mil crianças vacinadas, nos primeiros dez anos do programa.³⁶

Antes de ser usada em larga escala, implementações piloto de *RTS,S/AS01* com quatro doses na África Subsariana são recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS).^{2, 38} Estas implementações visam resolver algumas incertezas sobre a viabilidade da vacina no quotidiano, como a extensão da proteção em crianças cinco a dezassete

meses através de uma quarta dose verificada nos ensaios de fase III bem como o potencial papel na redução de mortalidade infantil.^{36, 38}

Com a parceria de Gana, Quênia e Malawi com a OMS no Programa de *Malaria Vaccine Initiative* (MVI), a *RTS,S* será disponibilizada em áreas selecionadas em três países a partir do início de 2018. Para tal, a vacina deverá ser previamente aprovada pela Autoridade Reguladora Nacional de África nos estudos de fase IV ou avaliação piloto. Em 2020, deverão ser expostas as primeiras reflexões sobre viabilidade do fornecimento de *Mosquirix*TM como o seu perfil de segurança em condições reais.³⁷

Finalmente, para fundamentar decisões futuras no desenvolvimento da vacina em larga escala deverão ser monitorizadas a viabilidade, a segurança e o impacto na sobrevivência das crianças até 2022.^{37, 38}

3.4. Vacina de esporozoíto inativado de *Plasmodium falciparum*

3.4.1. Desenvolvimento das vacinas *PfSPZ*

A vacina *RTS,S* demonstrou proteção em cerca de 50% dos voluntários adultos não imunes.³⁹ Estudos realizados há mais de cinquenta anos, com imunização com esporozoítos de *Plasmodium falciparum* atenuados em voluntários humanos demonstraram proteção superior a 90% nos participantes sujeitos a infeção controlada de malária em humanos (CHMI) através de picada de mosquitos *Anopheles* infetados.⁴⁰ A CHMI consistia na infeção dos participantes com picadas de mosquitos previamente infetados com gametócitos *Plasmodium falciparum* em cultura, tendo-se revelado fundamental na investigação das vacinas e resistências na Europa e Estados Unidos da América.⁴¹ Atualmente, a CHMI abrange também a indução da infeção através da inoculação do esporozoíto por via endovenosa (*PfSPZ Challenge*).^{42, 43}

No desenvolvimento da vacina de esporozoíto de *Plasmodium falciparum* há que ter em conta a proteção contra estirpes de parasitas *Plasmodium falciparum* homólogas e heterólogas. Parasitas com estirpes heterólogas correspondem a parasitas geneticamente e antigenicamente diferentes da estirpe imunizadora (por exemplo, a estirpe malária africana NF54) ao contrário das homólogas.⁴³

- Origem:

Desde o final de 1960, estudos com roedores em que se procedeu à injeção endovenosa de esporozoítos de *Plasmodium berghei* atenuados por radiação gama revelaram elevado potencial de proteção. O mesmo resultado foi obtido em investigações posteriores em humanos com *Plasmodium falciparum* atenuado também por radiação.⁴⁴ Entretanto, estudos em humanos concluíram que a proteção completa requeria picadas de mais de mil mosquitos portadores de esporozoítos de organismo inteiro atenuado.⁴⁵ Porém, a CHMI por picada, requer culturas de parasita apropriadas, insectários de mosquito e segurança e pessoal especializado, o que dificultaria a sua generalização.⁴¹ A imunização por agulha ou seringa, revelou, ao contrário da imunização por picada poder ser utilizada em larga escala.^{41, 46}

Em 2002, *Sanaria Inc.* foi criada, com o objetivo de desenvolver e comercializar uma vacina baseada no esporozoíto, que permitisse eliminação de malária nas regiões geograficamente definidas e que prevenisse malária em pessoas não imunes. Em 2003, esta organização desenvolveu pela primeira vez a vacina *PfSPZ*.⁴⁷

- Composição e Formulação:

A vacina *PfSPZ*, acrónimo para *Plasmodium falciparum* *Sporozoite* consiste numa vacina endovenosa com o parasita *Plasmodium falciparum* atenuado com radiação, com o fim de reproduzir a eficácia protetora obtida nos estudos anteriores.^{45,47} Os esporozoítos de *Plasmodium falciparum* são obtidos manualmente através da dissecação das glândulas salivares dos mosquitos. Estes são seguidamente irradiados e preservados com o fim de desenvolver uma vacina metabolicamente ativa e não replicativa (atenuada), assética e purificada.⁴⁵ Os esporozoítos atenuados são estabilizados pela criopreservação em azoto líquido de fase gasosa de -150°C a -196°C, o que facilita o seu transporte, permitindo a uniformização da dose infecciosa nos diferentes ensaios ao possibilitar a administração de um número de esporozoíto conhecido e predefinido.⁴⁸ Antes da administração, a vacina *PfSPZ* é descongelada e posteriormente diluída com uma solução tampão fosfato-salino (PBS) e albumina sérica humana, de modo a ser atingida uma dose correta.⁴⁹

- Ensaios Clínicos:

Ensaios clínicos em crianças com mais de seis meses e em adultos foram realizados em África, Europa e Estados Unidos da América, com o objetivo de determinar a via de administração e o regime de imunização necessários para uma máxima eficácia e segurança. Atualmente, ensaios clínicos encontram-se em progresso na Tanzânia, Quênia, Mali, Burkina Faso, Alemanha e nos Estados Unidos da América, para determinar a duração da proteção conferida pela vacina *PfSPZ* em adultos e em crianças. Com estes ensaios, pretende-se também estipular a eficácia para exposição com CHMI heterólogo, bem como encontrar vias de administração alternativas. À data de publicação, mil cento e sessenta e cinco voluntários receberam produtos baseados *PfSPZ* em mais de doze ensaios clínicos e em 2016 a vacina foi aprovada pela FDA.⁴⁷

Após estes ensaios, seguirá para os ensaios da fase seguinte (III) e, caso seja bem-sucedida, *PfSPZ* poderá obter parecer positivo por parte das entidades reguladoras.^{45, 47}

- Determinação da via de administração:

Um dos desafios no desenvolvimento da vacina tem sido a otimização do fabrico, regime de imunização e via de administração.⁴⁷ O primeiro ensaio clínico da vacina *PfSPZ*, em 2011, demonstrou numa amostra de oitenta adultos, que a vacina quer via subcutânea quer intradérmica, apesar de segura e bem tolerada, detinha baixa imunogenicidade e capacidade de proteção.⁵⁰ Por outro lado, a administração endovenosa da vacina em roedores e primatas não humanos revelou superioridade na indução de resposta imunológica celular, em estudos subsequentes, comparativamente à via subcutânea.⁵⁰ A elevada imunogenicidade da via de administração endovenosa foi corroborada posteriormente em humanos, num ensaio de escalação de dose.⁵¹

- Eficácia

Num ensaio de fase I, efetuado nos Estados Unidos da América e liderado pelo *Vaccine Research Center*, *National Institute of Allergy and Infectious Disease* e *National Institutes of Health* e *Sanaria Inc.*, foi verificado que *PfSPZ* protegia seis de seis participantes (100%), adultos não imunes, três semanas após a última de cinco doses da

vacina e, 55% após um mês com quatro doses de 2.7×10^5 *PfSPZ*.^{51,52} A eficácia verificada em indivíduos não expostos, foi de 64% após CHMI com parasita *Plasmodium falciparum* homólogo (NF54) e 8% com o parasita heterólogo (7G8), com o mesmo regime e dosagem.⁵³ Por outro lado, em indivíduos semimunes do Mali, vinte e quatro semanas após a última dose, a eficácia foi cerca de 29%.⁴⁰

A eficácia desta vacina demonstrou ser influenciada por vários fatores, dos quais *Epstein et al.* (2017) destacam a estirpe de *Plasmodium falciparum*. Esta conclusão foi corroborada quando *PfSPZ* não conseguia proteger contra CHMI heterólogo a longo prazo (período de vinte e quatro semanas), ao contrário do sucedido com o grupo homólogo. Entretanto, a curto prazo a vacina *PfSPZ* conseguiu proteger contra CHMI de *Plasmodium falciparum* heterólogo e homólogo, com proteção superior a 80%, três semanas após a última dose.⁵³

Ishisuka et al. (2016) relevam também outros fatores de heterogeneidade da eficácia, nomeadamente a via de administração, o regime de vacinação, a dosagem e a história de exposição prévia ao parasita.⁵²

Não se apresentam resultados de estudos realizados em crianças expostas e não expostas, pela reduzida dimensão da amostra dos mesmos, já que a vacina se encontra numa fase inicial de desenvolvimento, sendo que a duração da proteção da vacina também não é ainda conhecida.⁵²

- Determinação do regime de dose:

De modo a cumprir os objetivos estipulados pela OMS, foi avaliada a eficiência e tolerabilidade da vacina quando administrada por via endovenosa, em diferentes doses e intervalos.⁵³

O primeiro ensaio clínico de escalação de dose foi desenvolvido por *Vaccine Research Center e NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Disease)*, com injeção de *PfSPZ* por via endovenosa em quarenta voluntários humanos adultos. Segundo *Seder et al* (2013), a vacina revelou ser segura neste ensaio com doses de 1.35×10^5 *PfSPZ* com proteção total contra CHMI em seis de seis participantes que receberam cinco doses e em seis de nove voluntários que receberam quatro doses da mesma.⁵¹

Num outro ensaio clínico, verificou-se uma proteção de 55%, cinquenta e nove semanas depois da última dose, com quatro doses de 2.7×10^5 *PfSZP*. Além disso, segundo

Ishizuka et al (2016), com a mesma dose da vacina administrada, a eficácia foi superior com o aumento do número de imunizações (de quatro para cinco) após três semanas. A proteção conferida após vinte e uma semanas da última dose, foi superior no regime de 2.7×10^5 , quando comparado ao regime de 1.35×10^5 .⁵²

- Imunogenicidade:

A imunidade celular revelou ser crucial na proteção conferida pela vacina *PfSPZ*, através da eliminação dos parasitas invasores que se replicavam nos hepatócitos pelas células T CD8+, com a contribuição das células T CD4+, segundo ensaios em roedores e primatas não humanos. A importância da imunidade celular foi corroborada em investigações com roedores quando a proteção imunitária era conseguida após a depleção de imunidade humoral, ao contrário do que acontecia perante o défice nas células T.⁵⁰

A proteção duradoura após a imunização com esporozoítos *Plasmodium falciparum* atenuados pode ser explicada pela existência de células TCD8+ e TCD4+ memória e efectoras.^{51, 54}

A administração de esporozoítos atenuados de *Plasmodium falciparum* por picada difere da endovenosa. No primeiro caso, os antígenos são depositados na pele, penetram os vasos sanguíneos da derme e, através da rede linfática dirigem-se para o gânglio linfático mais próximo onde são reconhecidos pelas células detriticas residentes e apresentados como antígeno, induzindo a produção de células T CD8+ que migram para o fígado, onde eliminam o parasita no estadio hepático. Na injeção direta endovenosa de esporozoítos inativados por radiação, presume-se que ocorra *bypass* dos gânglios linfáticos.⁴⁴ Consequentemente, a imunidade protetora dependerá da ação das células dendríticas residentes no fígado e dos próprios hepatócitos que foram infetados, pelo que será no fígado que ocorrerá o reconhecimento e a apresentação de antígenos através de células apresentadoras de antígeno moléculas e MHC I dos hepatócitos infetados, com consequente produção de células T CD8+.^{44, 50} Os mecanismos de atuação das células TCD8+ na eliminação do parasita ainda são alvo de investigação, nomeadamente, mecanismos que envolvem a perforina e granzima, bem como a produção de IFN- γ .^{54,55} As células T CD8+ residentes no fígado produtoras de IFN- γ demonstraram conceder proteção à infeção.⁵⁰ Outros possíveis intermediários em investigação são T CD3+ gamadelta ($\gamma\delta$), IL-12, NK e NO.⁵⁵ Nos primeiros ensaios, com *PfSPZ* endovenoso em

humanos, verificou-se o aumento da percentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Constatou-se também a produção de IL2 e TNF por células memória T CD3⁺ CD4⁺, e de IFN- γ , principalmente por T CD3⁺CD8⁺ mas também por células memória T CD3⁺CD4⁺.⁵¹ Num ensaio posterior, também se verificou-se o aumento de número de células $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ .⁵⁵

As vias subcutânea e intradérmica de *PfSPZ* demonstraram não conseguir induzir número adequado de células TCD8⁺.⁵⁰ No entanto, após a inoculação endovenosa com as doses mais elevadas usadas em ensaios em humanos da vacina *PfSPZ* eram atingidos níveis elevados de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ e TCD4⁺ no fígado.⁵¹

Por outro lado, estudos realizados em roedores demonstraram que também os anticorpos específicos para o esporozoítio, como anticorpos anti-CSP, poderiam contribuir para a proteção imunológica.⁵⁶ Contudo a imunidade humoral pode ser independente do anticorpo anti-CSP, podendo ser causada após a exposição de outro antígeno.⁵¹ Como ainda não são conhecidos outros antígenos que não CSP que induzam isoladamente resposta protetora, o mais provável é que a resposta humoral seja desencadeada por múltiplos antígenos. Existe também escasso conhecimento sobre a especificidade, afinidade e subclasse requeridas para a proteção humoral do esporozoítio e evidência de proteção por anticorpos não anti - CSP.⁵⁷

- Segurança:

Ensaio realizados nos Estados Unidos da América, no Mali, bem como, na Guiné Equatorial demonstraram excelente perfil de segurança e de tolerabilidade da vacina *PfSPZ* via endovenosa. Na maior parte dos participantes não se observaram os efeitos adversos locais, como dor local ou equimose. Estes sintomas quando surgiram, eram de intensidade ligeira a moderada (grau I e II). Por outro lado, os efeitos adversos sistémicos, nomeadamente, cefaleias, fadiga, febre e mialgia, foram mais prevalentes, sendo predominantemente de intensidade ligeira.^{40, 49, 51}

Segundo *Sissoko et al* (2017), a frequência e a gravidade dos efeitos adversos locais e sistémicos observados no grupo vacinado e no grupo de controlo com placebo foram semelhantes.⁴⁰

Os efeitos adversos não solicitados que surgiram nos diferentes ensaios, maioritariamente ligeiros, não foram considerados relacionados com a vacina *PfSPZ*. Nos três ensaios não se verificaram nem efeitos adversos graves, nem aumento da gravidade dos efeitos com o aumento da dosagem.^{40, 49, 51} No primeiro ensaio, com a vacina endovenosa, observou-se um aumento das transaminases hepáticas, não dose dependente, em 40% dos voluntários. Contudo este aumento não foi observado no Mali, na Guiné Equatorial nem no estudo dos Estados Unidos de um ano de *follow up*.^{40, 49, 51, 52} No Mali, verificou-se ainda neutropénia e easinofilia, no entanto, estas alterações analíticas não foram relacionadas diretamente com a vacina.⁴⁰

3.4.2. Outras vacinas de esporozoítos atenuados

Investigações paralelas às da vacina com esporozoítos atenuados têm sido realizadas de modo a permitir uma imunização com esporozoítos atenuados não por irradiação, mas pela administração concomitante de quimioprofilaxia (como *PfSPZ-CVac*) ou através da Engenharia Genética (*PfSPZ-GAI*, por exemplo).⁴⁴

3.4.2.1. Vacina *PfSPZ* quimioatenuada

No âmbito da obtenção de uma vacina alternativa à *PfSPZ* atenuada por irradiação e que evitasse a infeção eritrocitária, e dado os resultados favoráveis em investigações prévias com administração concomitante de cloroquina em roedores e esporozoítos de *Plasmodium falciparum*, *PfSPZ Chemoprophylaxis Vaccine* (*PfSPZ-CVac*) foi desenvolvida pela *Sanaria Inc.*⁴⁴

Esta vacina corresponde à administração de um composto assético, purificado, criopreservado, com capacidade infecciosa, constituído por esporozoítos de *Plasmodium falciparum* não atenuados (denominado *PfSPZ Challenge*) em indivíduos a fazer quimioprofilaxia.⁵⁸ A associação com um quimioprofilático, como a cloroquina visa aumentar o efeito protetor, já que estas podem atuar de diretamente no estadio eritrocitário, sem ação hepática, complementando a ação dos esporozoítos.⁴⁴

Quanto à via de administração, verificou-se que a vacina conferia proteção mais elevada quando a administração dos esporozoítos por via intravenosa, comparativamente à subcutânea e intradérmica.^{59,60}

A imunização com *PfSPZ-CVAC* encontra-se em vantagem quando comparada com a vacina *PfSPZ* por requerer menor quantidade de parasitas para atingir eficácia protetora de alto nível. Isto porque, os parasitas não atenuados podem infectar o fígado e completar todo o estadio de desenvolvimento hepático. Além disso, estes replicam-se dez a quarenta mil vezes mais e expressam mais de 80% do proteoma de *Plasmodium falciparum* (com 4500 proteínas diferentes expressadas - incluindo proteínas do estadio sanguíneo). Deste modo, serão apresentados ao sistema imunitário maior quantidade de antígenos do que *PfSPZ* irradiado, pelo que existe maior probabilidade de originar proteção mais potente e prolongada.⁵⁹

No entanto, a administração de parasitas não atenuados requer um tratamento de imunização com antimaláricos prolongado de modo a evitar a instalação de sintomas associados à infecção eritrocitária.⁶¹

Assim, devido à sua maior potência, o desenvolvimento de *PfSPZ-CVac* constitui atualmente uma prioridade, sendo que mais ensaios clínicos deverão decorrer de modo a avaliar a sua segurança, o regime de administração e o quimioprolático mais seguro e eficaz. *PfSPZ-CVac* poderá ser, assim, a vacina mais adequada para campanhas de eliminação em locais onde a população já foi previamente e naturalmente exposta a malária.^{58,59}

3.4.2.2. Vacinas de Esporozoítos de *Plasmodium falciparum* Atenuados Geneticamente (GAP)

Outra abordagem criada para atenuar o *Plasmodium falciparum*, para além de irradiação e coadministração de antimaláricos, é a indução de mutações no parasita através de eliminação de determinados genes, através da Engenharia Genética.⁶¹

Atualmente, a *PfSPZ-GA1*, uma vacina geneticamente atenuada produzida por *Sanaria Inc.*, está sob investigação num ensaio clínico de fase I em humanos adultos não imunes, por via de administração endovenosa. Esta vacina é constituída por *Plasmodium falciparum* com deleção dos genes *b9* e *slarp* (ou *sap1*), sob forma de um produto assético, purificado e criopreservado.^{58, 59}

A vacina *PfSPZ-GA1*, tal como *PfSPZ-CVac*, tem potencial de induzir maior proteção do que *PfSPZ* inibido por irradiação, devido não só a existir maior expressão antigénica como também por permitir o desenvolvimento hepático do parasita. Assim, com o desenvolvimento desta vacina, pretende-se que os parasitas geneticamente atenuados possam mimetizar a *PfSPZ-CVac*, quanto à sua eficiência, mas sem necessidade de coadministrar antimaláricos.⁵⁹

3.4.3. Perspetivas para o futuro

Prevê-se um desenvolvimento rápido das vacinas à base de *PfSPZ* nos próximos dois anos, de modo a cumprir os objetivos definidos pela Organização Mundial de Saúde.⁴³ Porém, ainda existem pontos importantes a ser desenvolvidos. Um deles corresponde a uma via de administração alternativa não endovenosa mas igualmente protetora e segura. A duração da proteção para espécies heterólogas de *Plasmodium falciparum* é outra questão fundamental, na medida que existem várias espécies de *Plasmodium falciparum* em áreas endémicas de malária.⁵²

Quanto ao desenvolvimento da vacina *PfSPZ*, a segurança e eficácia desta vacina endovenosa ainda não foi avaliada em crianças e em sujeitos de regiões endémicas. A via de administração e o regime de dose para uma proteção máxima e segura para *Plasmodium falciparum* homólogo e heterólogo, bem como a identificação de mecanismos mediadores de proteção ainda estão a ser estudados. Para uma produção de *PfSPZ* em larga escala mais eficiente, são necessárias culturas *in vitro* de esporozoítos de *Plasmodium falciparum* aliadas a uma melhoria dos métodos de crioconservação dos mesmos, alvo de investigação atual. Além disso, são requeridos sistemas de distribuição mais fortes e com capacidade de administração e armazenamento destas vacinas em populações de risco de regiões endémicas.^{8,44,52}

Por outro lado, as vacinas químio e geneticamente atenuadas carecem de investigação relativamente à sua segurança e ao regime de dosagem para uma maior proteção. Necessitam, assim, de ser avaliadas em maior número de adultos não expostos, assim como em voluntários de regiões endémicas e crianças. Outro fator a investigar para a vacina atenuada por quimioprofilaxia será o antimalárico com melhores resultados de eficácia e segurança.^{58, 59}

4. Discussão de Resultados

A persistência de elevadas taxas de morbidade e mortalidade, apesar dos esforços realizados na profilaxia nos últimos anos contra a malária, tem constituído um grave problema de saúde pública. Consequentemente, surgiu a necessidade de complementar as medidas profiláticas existentes com uma vacina que protegesse grupos de maior risco, nomeadamente, crianças habitantes de regiões endémicas, grávidas e indivíduos não imunes que se deslocam para regiões endémicas.

O parasita *Plasmodium falciparum* constitui um alvo importante por se associar a uma elevada morbidade e mortalidade por malária observada em regiões endémicas como África Subsariana, local de maior incidência e mortalidade de malária, e onde esta espécie é mais prevalente. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu, assim, que a vacina deveria reduzir 75% dos casos de malária clínica e diminuir a transmissão do *Plasmodium falciparum* durante três meses com um máximo de três doses em crianças de regiões endémicas. Contudo, a diversidade genética do parasita e o fato do seu ciclo de vida ser multifacetado têm sido as principais limitações para o desenvolvimento da vacina.

Este artigo de revisão aborda dois grupos de vacinas que estão em fases avançadas do seu desenvolvimento, *RTS,S* e as vacinas à base de esporozoítos de *Plasmodium falciparum* inativado: *PfSPZ*, *PfSPZ-CVac* e *PfSPZ-GAI*, atenuadas respetivamente por irradiação, quimioprofilaxia e mutação genética. Ambos atuam no *Plasmodium falciparum* no estadio pré-eritrocitário, impedindo a infeção eritrocitária e o consequente desenvolvimento de malária clínica. *RTS,S* é a vacina que se encontra numa fase mais avançada de desenvolvimento, mas as restantes vacinas abordadas nesta revisão encontram-se em rápida evolução.

Apesar da eficácia, imunogenicidade e segurança demonstrada por *RTS,S*, os resultados de proteção obtidos em ensaios de fase III foram inferiores às expectativas não cumprindo os objetivos da OMS, para além de se verificar proteção significativa apenas no grupo de crianças entre cinco a dezassete meses de idade. A menor proteção em crianças de seis a doze semanas poderá ser explicada pela menor capacidade de reprodução de novas respostas imunitárias.²² A inclusão de menor número de crianças participantes, com maior proporção de participantes de áreas de baixa transmissão em ensaios de fase II pode explicar a maior eficácia obtida quando comparada com ensaios

de fase III. É de realçar que a pressuposição de que a exposição se mantém constante ao longo do tempo pode ter interferido com alguns dos resultados obtidos nos ensaios.²⁰

Além disso, a redução da eficácia de *RTS,S* ao longo dos *follow-ups* e o seu valor negativo alertam para possibilidade de recorrência de malária, sendo que este dado não é animador. Esta diminuição observada pode não só dever-se à diminuição das repostas imunológicas protetoras induzidas pela vacina, como também à maior rapidez na aquisição de imunidade no grupo de controlo, à redução da exposição ao parasita e consequente atraso na aquisição de imunidade natural.⁶²

As vacinas de esporozoíto são multiantigénicas, ao contrário de *RTS,S*, pelo que é de esperar sejam superiores quanto à imunogenicidade. Este fato, poderá explicar a elevada proteção (90%) aquando a inoculação de esporozoítos atenuados por picada, comparativamente à *RTS,S*. A menor proteção por *RTS,S* poderá ainda ser explicada pela menor capacidade de induzir respostas mediadas por células T CD8+, quando comparada com a inoculação de esporozoítos. Além do mais, a vacina de esporozoíto demonstrou proteção não só para *Plasmodium falciparum* homólogo como para heterólogo, tendo maior vantagem, possivelmente, em regiões endémicas, onde poderão coexistir múltiplas estirpes do parasita.

Comparativamente à vacina *PfSPZ*, a *PfSPZ-CVac* e *PfSPZ-GA1* poderão contribuir para uma proteção superior, por beneficiarem de uma superioridade no número de antígenos e por permitirem que *Plasmodium falciparum* termine o estadio hepático, pelo que poderão ser fortes candidatas a considerar futuramente.

Contudo, a vacina *PfSPZ* apenas demonstrou proteção significativa quando administrada em via endovenosa, o que torna a administração da vacina menos prática, quando comparada com a via subcutânea. É de acrescentar que a produção e a estabilização desta vacina requerem elevado investimento em instalações e equipamentos bem como pessoal especializado. Por conseguinte, as características de *PfSPZ*, relativamente à sua produção, estabilização e via de administração, inviabilizam a sua utilização em larga escala.

Acresce que as vacinas de esporozoíto inativado ainda se encontram em fase iniciais, sobretudo, a *PfSPZ-CVac* e *PfSPZ-GA1*. Assim, o número de ensaios realizados em humanos e o número de dados obtidos até agora é reduzido, pelo que dificilmente os resultados poderão ser valorizados, para fundamentar possíveis conclusões. É, também, de salientar que os ensaios com *PfSPZ* foram realizados sobretudo em adultos não imunes, o que torna difícil prever a proteção nas populações alvo da vacina idealizada como

crianças de regiões endêmicas e comparar com *RTS,S*, que possui resultados mais fidedignos para a utilização da vacina em condições reais. É, deste modo, necessário um estudo mais aprofundado das vacinas de esporozoíto em populações endêmicas, relativamente à sua segurança e eficácia, e, ainda, do regime de dosagem na *PfSPZ-CVac* e *PfSPZ-GA1* e o quimioprofilático para a primeira que permita o maior benefício.

Esta discrepância encontrada entre os dois grupos de vacinas, que se encontram em fases diferentes de desenvolvimento, foi a principal dificuldade encontrada ao longo da elaboração desta revisão. Espera-se, deste modo, que esta dificuldade seja ultrapassada futuramente, com a evolução tecnológica e o maior número de ensaios com populações mais numerosas e que mimetizem as populações alvo.

Não obstante nenhuma destas vacinas ter atingido os objetivos delineados pela Organização Mundial de Saúde, com o rápido desenvolvimento na última década da área de vacinação na malária a nível dos molecular, genético, epidemiológico e clínico e com o avanço tecnológico, este objetivo aparenta estar cada vez mais próximo de ser atingido.

5. Conclusão

Com o avanço científico e tecnológico, tem-se assistido ao rápido aparecimento de vacinas antimaláricas, de modo a colmatar as elevadas taxas de morbidade e mortalidade por malária nos grupos considerados de risco, apesar da implementação de medidas profiláticas.

Não obstante as dificuldades inerentes ao desenvolvimento de vacinas contra *Plasmodium falciparum*, são várias as candidatas. A *RTS,S* é a que se encontra numa fase mais avançada e a única aprovada pela Agência Europeia do Medicamento, tendo-se revelado significativamente segura, eficaz e imunogénica, ainda que apenas em crianças de cinco a dezassete meses. Entretanto, assiste-se a um crescimento acelerado das vacinas de esporozoíto, vacinas também pré-eritrocitárias. Contudo, apesar de estas apresentarem potencial para garantir proteção superior comparativamente a *RTS,S*, não é ainda possível prever elevada segurança e efetividade para a sua generalização.

Independentemente de ambos os grupos de vacinas terem demonstrado não cumprir ainda os objetivos definidos pela Organização Mundial de Saúde, o interesse no seu uso em larga escala continua a ser um propósito a atingir.

6. Bibliografia

- 1) World Health Organization (2017) World Malaria Report 2017.
- 2) World Health Organization (2016) Malaria vaccine: WHO position paper-January 2016. *Weekly Epidemiological Record*, 4 (91), 33–52.
- 3) Cibulskis, R.E., Alonso, P., Aponte, J., Aregawi, M., Barrette, A., Bergeron, L., et al. (2016) Malaria: Global progress 2000 - 2015 and future challenges. *Infectious Diseases of Poverty*, 5 (1) , 1–8.
- 4) Nega, D., Alemu, A. and Tasew, G. (2016) Malaria Vaccine Development: Recent Advances alongside the Barriers. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 7 (6), 1–7.
- 5) Cowman, A.F., Healer, J., Marapana, D. and Marsh, K. (2016) Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 167 (3), 610–624.
- 6) Moreno, A. and Joyner, C. (2015). Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. *Current Opinion in Immunology*, 35, 98-106.
- 7) Phillips, M.A., Burrows, J.N., Manyando, C., Van Huijsduijnen, R.H., Van Voorhis, W.C. and Wells, T.N.C. (2017) Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1-19.
- 8) Hill, A. (2011). Vaccines against malaria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1579), pp.2806-2814.
- 9) Vandoolaeghe, P. and Schuerman, L. (2016) The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination. *Expert Review of Vaccines*, 15 (12), 1481–1493.
- 10) Stanisci, D., Barry, A. and Good, M. (2013). Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. *Trends in Parasitology*, 29(12), 612-622.
- 11) Wilby, K.J., Lau, T.T.Y., Gilchrist, S.E. and Ensom, M.H.H. (2012) Mosquirix (RTS,S): a novel vaccine for the prevention of Plasmodium falciparum malaria. *The Annals of pharmacotherapy*, 46 (3), 384–93.
- 12) Malaria Vaccine Funders Group. Malaria Vaccine Technology Roadmap. World Health Organization. http://www.who.int/immunization/topics/malaria/vaccine_roadmap/TRM_update_nov13.pdf?ua=1. Acedido a 22 de Outubro de 2017.
- 13) GSK Biologicals, Malaria Vaccine Initiative. Fact Sheet: RTS,S Malaria vaccine candidate. http://www.malariavaccine.org/sites/www.malariavaccine.org/files/content/page/files/RTSS%20vaccine%20candidate%20Factsheet_FINAL.pdf . Acedido a 14 de Setembro de 2017.
- 14) Agnandji, S.T., Fernandes, J.F., Bache, E.B. and Ramharter, M. (2015) Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I–III trials. *Future Microbiology*, 10 (10), 1553–1578.
- 15) Sacarlal, J., Aponte, J., Aide, P., Mandomando, I., Bassat, Q., Guinovart, C. et al. (2008). Safety of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children during a Phase IIb trial. *Vaccine*, 26(2), pp.174-184.
- 16) Agnandji, S.T., Asante, K.P., Lyimo, J., Vekemans, J., Soulanoudjingar, S.S., Owusu, R., et al. (2010) Evaluation of the safety and immunogenicity of the RTS,S/AS01E malaria candidate vaccine when integrated in the expanded program of immunization. *The Journal of infectious diseases*, 202 (7), 1076–87.
- 17) Bejon, P., D, P., Lusingu, J., Olotu, A., B, C., Leach, A., et al. (2009) UKPMC Funders Group Author Manuscript Efficacy of RTS, S / AS01E Vaccine against Malaria in Children 5 to 17 Months of Age. *PLoS Medicine*, 359 (24), 2521–2532.

- 18) Olotu, A. and Ch, B. (2016) Four-Year Efficacy of RTS , S / AS01E and Its Interaction with Malaria Exposure. 368 (12), 1111–1120.
- 19) Olotu, A. and Ph, D. (2016) Seven-Year Efficacy of RTS, S / AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. *New England Journal of Medicine*, 374 (26), 2519–2529.
- 20) Bejon, P., White, M., Olotu, A., Bojang, K., Lusingu, J., Salim, N. et al. (2013). Efficacy of RTS,S malaria vaccines: individual-participant pooled analysis of phase 2 data. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(4), pp.319-327.
- 21) Warimwe, G.M., Fletcher, H.A., Olotu, A., Agnandji, S.T., Hill, A.V.S., Marsh, K., et al. (2013) Peripheral blood monocyte-to-lymphocyte ratio at study enrollment predicts efficacy of the RTS,S malaria vaccine: Analysis of pooled phase II clinical trial data. *BMC Medicine*, 11 (1), 1-6.
- 22) The RTS,S Clinical Trials Partnership (2011). , First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *New England Journal of Medicine*, 365(20),.1863-1875.
- 23) The RTS,S Clinical Trials Partnership. (2014) Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS medicine*, 11 (7), e1001685.
- 24) The RTS,S Clinical Trials Partnership (2015) Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. (2015). *The Lancet*, 386(9988), pp.31-45.
- 25) The RTS,S Clinical Trials Partnership. (2012) A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *New England Journal of Medicine*, 367(24), pp.2284-2295.
- 26) Bejon, P., Cook, J., Bergmann-Leitner, E., Olotu, A., Lusingu, J. et al. (2011). Effect of the Pre-erythrocytic Candidate Malaria Vaccine RTS,S/AS01E on Blood Stage Immunity in Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(1), pp.9-18.
- 27) Ajua, A., Lell, B., Agnandji, S., Asante, K., Owusu-Agyei, S. et al. (2015). The effect of immunization schedule with the malaria vaccine candidate RTS,S/AS01E on protective efficacy and anti-circumsporozoite protein antibody avidity in African infants. *Malaria Journal*, 14(1), p.72.
- 28) Olotu, A., Clement, F., Jongert, E., Vekemans, J., Njuguna, P., Ndungu, F., Marsh, K., Leroux-Roels, G. and Bejon, P. (2014). Avidity of Anti-Circumsporozoite Antibodies following Vaccination with RTS,S/AS01E in Young Children. *PLoS ONE*, 9(12), p.e115126.
- 29) Chaudhury, S., Ockenhouse, C., Regules, J., Dutta, S., Wallqvist, A. et al. (2016). The biological function of antibodies induced by the RTS,S/AS01 malaria vaccine candidate is determined by their fine specificity. *Malaria Journal*, 15(1).
- 30) Aide, P., Aponte, J., Renom, M., Nhampossa, T., Sacarlal, J. et al. (2010). Safety, Immunogenicity and Duration of Protection of the RTS,S/AS02D Malaria Vaccine: One Year Follow-Up of a Randomized Controlled Phase I/IIb Trial. *PLoS ONE*, 5(11), p.e13838.
- 31) Lell, B., Agnandji, S., von Glasenapp, I., Haertle, S., Oyakhiromen, S., Issifou, S. et al. (2009). A Randomized Trial Assessing the Safety and Immunogenicity of AS01 and AS02 Adjuvanted RTS,S Malaria Vaccine Candidates in Children in Gabon. *PLoS ONE*, 4(10), p.e7611.

- 32) Abdulla, S., Salim, N., Machera, F., Kamata, R., Juma, O., Shomari, M., et al. (2013) Randomized, controlled trial of the long term safety, immunogenicity and efficacy of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants living in a malaria-endemic region. *Malaria Journal*, 12 (1), 11, 1-11.
- 33) Leroux-Roels, G., Leroux-Roels, I., Clement, F., Ofori-Anyinam, O., Lievens, M., Jongert, E., Moris, P., Ballou, W. and Cohen, J. (2014). Evaluation of the immune response to RTS,S/AS01 and RTS,S/AS02 adjuvanted vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(8), pp.2211-2219.
- 34) Lumsden, J., Schwenk, R., Rein, L., Moris, P., Janssens, M., Ofori-Anyinam, O., Cohen, J., Kester, K., Heppner, D. and Krzych, U. (2011). Protective Immunity Induced with the RTS,S/AS Vaccine Is Associated with IL-2 and TNF- α Producing Effector and Central Memory CD4⁺ T Cells. *PLoS ONE*, 6(7), p.e20775.
- 35) Lusingu, J., Olotu, A., Leach, A., Lievens, M., Vekemans, J. et al. (2010). Safety of the Malaria Vaccine Candidate, RTS,S/AS01E in 5 to 17 Month Old Kenyan and Tanzanian Children. *PLoS ONE*, 5(11), p.e14090.
- 36) Penny, M., Galactionova, K., Tarantino, M., Tanner, M. and Smith, T. (2015). The public health impact of malaria vaccine RTS,S in malaria endemic Africa: country-specific predictions using 18 month follow-up Phase III data and simulation models. *BMC Medicine*, 13(1).
- 37) Malaria Vaccine Initiative Path – RTS,S Ghanam Kenya and Malawi to take part in WHO malária vaccine pilot programme- <http://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/first-generation-vaccine/rtss-> acedido em 9 de Outubro de 2017.
- 38) Malaria Vaccine Initiative Path – The RTS,S malária vaccine candidate http://www.malariavaccine.org/sites/www.malariavaccine.org/files/content/page/files/mvi_CVIA_rtss.pdf acedido 9 de Outubro de 2017.
- 39) Kester, K., Cummings, J., Ockenhouse, C., Nielsen, R., Hall, B. et al. (2008). Phase 2a trial of 0, 1, and 3 month and 0, 7, and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*, 26(18), pp.2191-2202.
- 40) Sissoko, M., Healy, S., Katile, A., Omaswa, F., Zaidi, I. et al (2017). Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against Plasmodium falciparum via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(5), pp.498-509.
- 41) Hodgson, S., Juma, E., Salim, A., Magiri, C., Njenga, D. et al (2015). Lessons learnt from the first controlled human malaria infection study conducted in Nairobi, Kenya. *Malaria Journal*, 14(1).
- 42) Gómez-Pérez, G., Legarda, A., Muñoz, J., Sim, B., Ballester, M. et al. (2015). Controlled human malaria infection by intramuscular and direct venous inoculation of cryopreserved Plasmodium falciparum sporozoites in malaria-naïve volunteers: effect of injection volume and dose on infectivity rates. *Malaria Journal*, 14(1).
- 43) Hickey, B., Lumsden, J., Reyes, S., Sedegah, M., Hollingdale, M. et al. (2016). Mosquito bite immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites: safety, tolerability, protective efficacy and humoral immunogenicity. *Malaria Journal*, 15(1).
- 44) Hollingdale, M. and Sedegah, M. (2016). Development of whole sporozoite malaria vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 16(1), pp.45-54.

- 45) Hoffman, S.L., Billingsley, P.F., James, E., Richman, A., Loyevsky, M., Li, T., et al. (2010) Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Human Vaccines*, 6 (1), 97–106.
- 46) Sheehy, S., Spencer, A., Douglas, A., Sim, B., Longley, R. et al (2013). Optimising Controlled Human Malaria Infection Studies Using Cryopreserved *P. falciparum* Parasites Administered by Needle and Syringe. *PLoS ONE*, 8(6), p.e65960.
- 47) Sanaria – Foundation for mission statement. <http://www.sanaria.com/index.php?s=38>, acedido dia 28 de Outubro de 2017.
- 48) Garcia, C.R., Manzi, F., Tediosi, F., Hoffman, S.L. and James, E.R. (2013) Comparative cost models of a liquid nitrogen vapor phase (LNVP) cold chain-distributed cryopreserved malaria vaccine vs. a conventional vaccine. *Vaccine*, 31 (2), 380–386.
- 49) Olotu, A., Urbano, V., Hamad, A., Eka, M., Chemba, M., Raso, J., et al. Advancing Global Health through Development and Clinical Trials Partnerships : A Randomized , Placebo-Controlled , Double-Blind Assessment of Safety , Tolerability , and Immunogenicity of Plasmodium falciparum Sporozoites Vaccine for Malaria in Healthy Eq.
- 50) Epstein, J., Tewari, K., Lyke, K., Sim, B., Billingsley, P. et al. (2011). Live Attenuated Malaria Vaccine Designed to Protect Through Hepatic CD8+ T Cell Immunity. *Science*, 334 (6055), pp.475-480.
- 51) Seder, R.A., Chang, L.J., Enama, M.E., Zephir, K.L., Sarwar, U.N., Gordon, I.J., et al. (2013) Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*, 341 (6152), 1359–1365.
- 52) Ishizuka, A.S., Lyke, K.E., DeZure, A., Berry, A.A., Richie, T.L., Mendoza, F.H., et al. (2016) Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nature Medicine*, 22 (6), 614–623.
- 53) Epstein, J.E., Paolino, K.M., Richie, T.L., Sedegah, M., Singer, A., Ruben, A.J., et al. (2017) Protection against Plasmodium falciparum malaria by PfSPZ Vaccine. *JCI Insight*, 2, 1–14. <https://insight.jci.org/articles/view/89154>.
- 54) Bijker, E.M., Schats, R., Visser, L.G., Sauerwein, R.W. and Scholzen, A. (2015) Ex vivo lymphocyte phenotyping during Plasmodium falciparum sporozoite immunization in humans. *Parasite Immunology*, 37 (11), 590–598.
- 55) Bijker, E.M., Teirlinck, A.C., Schats, R., Van Gemert, G.J., Van De Vegte-Bolmer, M., Van Lieshout, L., et al. (2014) Cytotoxic markers associate with protection against malaria in human volunteers immunized with plasmodium Falciparum Sporozoites. *Journal of Infectious Diseases*, 210 (10), 1605–1615.
- 56) Dups, J.N., Pepper, M. and Cockburn, I.A. (2014) Antibody and B cell responses to Plasmodium sporozoites. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–7.
- 57) Nahrendorf, W., Scholzen, A., Bijker, E.M., Teirlinck, A.C., Bastiaens, G.J.H., Schats, R., et al. (2014) Memory B-cell and antibody responses induced by Plasmodium falciparum sporozoite immunization. *Journal of Infectious Diseases*, 210 (12), 1981–1990.
- 58) Hoffman, S.L., Vekemans, J., Richie, T.L. and Duffy, P.E. (2015) The March Toward Malaria Vaccines HHS Public Access. *Am J Prev Med*, 49 (6), 319–333.
- 59) Richie, T., Billingsley, P., Sim, B., James, E., Chakravarty, S. et al. (2015). Progress with Plasmodium falciparum sporozoite (PfSPZ)-based malaria vaccines. *Vaccine*, 33(52), pp.7452-7461.
- 60) Bastiaens, G.J.H., Van Meer, M.P.A., Scholzen, A., Obiero, J.M., Vatanashenassan, M et al. (2016) Safety, immunogenicity, and protective efficacy of intradermal immunization with

aseptic, purified, cryopreserved plasmodium falciparum sporozoites in volunteers under chloroquine prophylaxis: A randomized controlled trial. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94 (3), 663–673.

- 61) Spring, M., Murphy, J., Nielsen, R., Dowler, M., Bennett, J. et al. (2013). First-in-human evaluation of genetically attenuated Plasmodium falciparum sporozoites administered by bite of Anopheles mosquitoes to adult volunteers. *Vaccine*, 31(43), pp.4975-4983.
- 62) Mahmoudi, S. and Keshavarz, H. (2017). Efficacy of Phase 3 Trial of RTS, S/AS01 Malaria Vaccine in infants: a systematic review and meta-analysis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. DOI:<http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2016.1271686>.

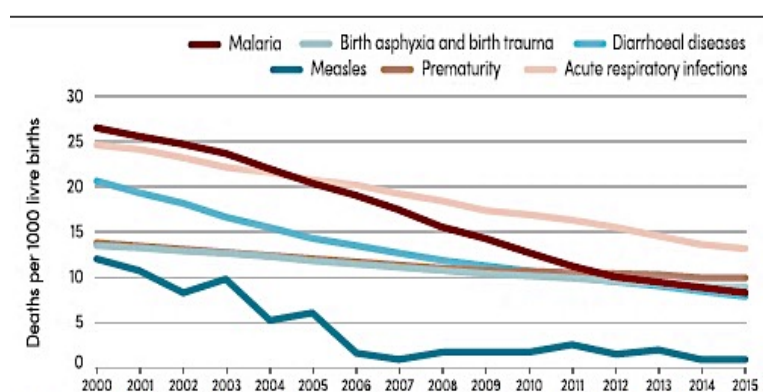
7. Anexos

Anexo 1 - Tabela referente ao número de casos estimados de malária em 2016, com intervalos de confiança (CI) de 95% dos limites superiores e inferiores, adaptada de World Health Organization (2017) World Malaria Report 2017 – p.33 .¹

	Number of cases (000)						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Lower 95% CI	218 000	207 000	199 000	191 000	191 000	192 000	196 000
Estimated total	237 000	225 000	217 000	210 000	210 000	211 000	216 000
Upper 95% CI	278 000	267 000	262 000	256 000	256 000	257 000	263 000

Anexo 2 - Tabela ilustrativa do número estimado de mortes por malária entre 2010 e 2016 de World Health Organization (2017) World Malaria Report 2017 – p.41.¹

	Number of deaths						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
African	538 000	484 000	445 000	430 000	423 000	409 000	407 000
Eastern Mediterranean	7 200	7 100	7 700	7 800	7 800	7 600	8 200
European	0	0	0	0	0	0	0
Americas	830	790	630	620	420	450	650
South-East Asia	41 700	34 000	29 000	22 000	25 000	26 000	27 000
Western Pacific	3 800	3 300	4 000	4 300	2 900	2 600	3 300
World	591 000	529 000	487 000	465 000	459 000	446 000	445 000



Anexo 3 – Gráfico referente às principais causas de mortalidade em crianças de África Subsaariana com menos de cinco anos entre 2000 e 2015, de Cibulskis, R.E., Alonso, P et al. (2016) Malaria: Global progress 2000 - 2015 and future challenges. *Infectious Diseases of Poverty*, p.6.³

Anexo 4 – Tabela ilustrativa das características dos ensaios de fase I e II de RTS,S em populações adultas não imunes e sua eficácia, adaptado de Agnandji et al. (2015) Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I–III trials. *Future Microbiology*, 10 (10), pp.1557-1558.¹⁴

Study population	Methods of VE evaluation	Vaccine formulations and study groups	Efficacy number of protected n/N point estimate % (95%CI)
USA: 18–40 years Malaria naïve Phase IA	Homologous sporozoite challenge: 10–14 days after third vaccination 0, 2 and 6 months vaccination schedule	RTS,S-Alum	0/6
		RTS,S/Alum/MPL (or RTS,S/AS04)	2/8
USA: 18–45 years Malaria-naïve Phase IA	Homologous sporozoite challenge: 21 days after third vaccination 0, 1, 7 months vaccination schedule	RTS,S/Alum/MPL (or RTS,S/AS04)	1/8
		RTS,S in an oil-in-water emulsion (RTS,S/AS03)	2/7
		RTS,S/MPL/QS21 in an oil-in-water emulsion (RTS,S/AS02)	6/7
USA: 18–45 years Malaria naïve Phase IA	Homologous sporozoite rechallenge of above protected volunteers: 6–7 months after third dose	RTS,S/Alum/MPL (or RTS,S/AS04)	1/1
		RTS,S in an oil-in-water emulsion (RTS,S/AS03)	0/1
		RTS,S/MPL/QS21 in an oil-in-water emulsion (RTS,S/AS02)	1/5
USA: 18–45 years Malaria-naïve Phase I–IIA	Homologous sporozoite challenge: 14–28 days after third vaccination 0, 1, 9 months vaccination schedule	RTS,S/AS02: 50 µg: 1 dose	3/10
		RTS,S/AS02: 50 µg: 2 doses	7/14
		RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses	3/6
		RTS,S/AS02: 25 µg: 3 doses	3/7
		RTS,S/AS02: 10 µg: 3 doses	1/4
		Overall	41 (22–56)
USA: 18–45 years Malaria naïve Phase IIA	Homologous sporozoite challenge: 14 days after second vaccination 0, 1 month vaccination schedule	RTS,S/AS02: 50 µg: 2 doses, lyophilized formulation 19 RTS,S/AS02 vs 6 controls	42 (5–63)
USA: 18–45 years Malaria-naïve Phase IIA	Homologous sporozoite challenge: 14 days after third vaccination 0, 1, 3 months vaccination schedule	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses 20 RTS,S/AS02 vs 12 controls	45 (18–62)
	Homologous sporozoite challenge: 14 days after third vaccination 0, 7, 28 days vaccination schedule	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses lyophilized formulation 18 RTS,S/AS02 vs 12 controls	39 (11–56)
USA: 18–45 years Malaria-naïve Phase IIA	Homologous sporozoite challenge: 14–21 days after third vaccination 0, 1, 2 months vaccination schedule	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses lyophilized formulation 44 RTS,S/AS02 vs 24 controls	31.8 (17.6–47.6)
	Homologous sporozoite challenge: 14–21 days after third vaccination 0, 1, 3 months regimen	RTS,S/AS01: 50 µg: 3 doses lyophilized formulation 36 RTS,S/AS01 vs 24 controls	50 (32.9–67.1)
	Homologous sporozoite rechallenge of above-protected volunteers: 6–7 months after third dose	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses lyophilized formulation 9 RTS,S/AS02 vs 12 controls	44.4 (10.9–79.2)
		9 RTS,S/AS01 vs 12 controls	

Anexo 5– Tabela ilustrativa das características dos ensaios de fase I e II de RTS,S em populações adultas semimunes de regiões africanas endêmicas e sua eficácia. Adaptado de Agnandji et al. (2015) Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I–III trials. *Future Microbiology*, 10 (10), pp.1557-1558.¹⁴

Study population	Methods of VE evaluation	Vaccine formulations and study groups	Efficacy number of protected n/N point estimate % (95%CI)
Gambia: 18–45 years Phase I–IIb	Exposure to natural <i>P. falciparum</i> infections during transmission season assessed from 14 days after third dose 0, 1, 6 months vaccination schedule (passive and active cases detection) for about 4 months. Efficacy against infection	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses 131 RTS,S/AS02 vs 119 controls	34 (8–53)
	Exposure to natural <i>P. falciparum</i> infections during transmission season assessed from 14 days after third dose 0, 1, 6 months regimen (passive and active cases detection) for about 4 months. Efficacy against infection	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses plus a booster dose the following year 73 RTS,S/AS02 vs 85 controls	47 (4–71)
Kenya: 18–35 years Phase I–IIb	Exposure to natural <i>P. falciparum</i> infections during transmission season assessed from 14 days after third dose 0, 1, 2 months vaccination schedule (passive and active cases detection) for about 4 months. Efficacy against infection	RTS,S/AS02: 50 µg: 3 doses lyophilized formulation	31.7 (-11.6–58.2)
	Exposure to natural <i>P. falciparum</i> infections during transmission season assessed from 14 days after third dose 0, 1, 2 months vaccination schedule (passive and active cases detection) for about 4 months. Efficacy against infection	79 RTS,S/AS02 vs 75 controls RTS,S/AS01: 50 µg: 3 doses lyophilized formulation	29.5 (-15.4–56.9)
74 RTS,S/AS02 vs 75 controls			

Anexo 6– Tabela referente às características dos ensaios II de RTS,S em populações de regiões africanas endêmicas e eficácia da vacina. Fonte: Bejon, P. et al. (2013). Efficacy of RTS,S malaria vaccines: individual-participant pooled analysis of phase 2 data. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(4), p.320.²⁰

	Patients (n)	Active vaccine	Control vaccine	Surveillance	Median age (IQR)	Local parasite prevalence (%) ^a	Bednet use	Efficacy (95% CI)
Gambia	250	RTS,S/AS02A	Rabies	ACDi, weekly blood films	24 years (19–34)	70	13%	34% (8 to 53)
Mozambique (cohort 1)	1589	RTS,S/AS02A	Hepatitis B or pneumococcal conjugate/Haemophilus influenzae type B	PCD	35 months (24–48)	40	4.5%	30% (11 to 45)
Mozambique (cohort 2)	411	RTS,S/AS02A	Hepatitis B or pneumococcal conjugate/H influenzae type B	ACDi, blood films every 2 weeks for 9 months then passive only	36 months (24–45)	70	22%	45% (31 to 56)
Bagamoyo, Tanzania	209	RTS,S/AS01E	Placebo	PCD	1.8 months (1.7–1.9)	30	Not recorded	53% (26 to 70)
Gabon	215	RTS,S/AS01E	Placebo	PCD	1.5 months (1.4–1.7)	5	Not recorded	53% (26 to 70)
Ghana	81	RTS,S/AS01E	Placebo	PCD	1.6 months (1.5–1.8)	80	Not recorded	53% (26 to 70)
Kilifi, Kenya	447	RTS,S/AS01E	Rabies	ACDc, weekly visits	11 months (8–14)	35	59%	53% (28 to 69)
Korogwe, Tanzania	447	RTS,S/AS01E	Rabies	ACDc, weekly visits	12 months (9–15)	15	52%	53% (28 to 69)
Kisumu, Kenya	250	RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B	Rabies	ACDi, weekly blood films	25 years (21–29)	60	0%	30% (-15 to 57)
Mozambique (infants)	214	RTS,S/AS02D	Hepatitis B	ACDi, blood films every 2 weeks	1.8 months (1.8–2.1)	45	100%†	66% (43 to 80)
Bagamoyo, Tanzania (infants)	340	RTS,S/AS02D	Hepatitis B	ACDi, blood films every 2 weeks	1.9 months (1.8–2)	30	100%†	65% (21 to 85)

ACDi=active case detection for infection. ACDc=active case detection for clinical malaria. PCD=passive case detection for clinical malaria. ^aAge-corrected parasite prevalence data taken from the Malaria Atlas Project. †Bednets were distributed to every child taking part in these trials and 100% use is assumed.